

細菌性粘菌Dictyostelium discoideumにおけるサイクリックAMPによるホスホジェステラーゼの誘導に関する研究

著者	山崎 フミ恵
号	230
発行年	1982
URL	http://hdl.handle.net/10097/15432

氏 名（本籍） やま さき ふ み え
山 寄 フ ミ 恵

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 230 号

学位授与年月日 昭和 58 年 3 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 細菌性粘菌 *Dictyostelium discoideum*
におけるサイクリック AMP によるホスホ
ジェステラーゼの誘導に関する研究

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 鶴 藤 丞 教授 野 副 重 男

教授 鈴 木 康 男

論文内容要旨

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は食餌がなくなると、サイクリックAMP（以下cAMPと略記）を走化性因子として集合し多細胞体を形成する。これはやがて移動体になり、最終的には胞子と柄との、わずかに2種類の細胞からなる子実体を形成する。すなわち細胞性粘菌は次のような特徴をもっている。

①胞子と柄の2種類の細胞にしか分化しないために、分化の調節機構を解明する上で非常に簡便なモデルとなりうる。②単細胞がcAMPにより集合し多細胞体を形成することから、組織形成は生物の正常な発生過程で自然にみることができる。③子実体は発芽すると、もとの未分化なアメーバを生じる。すなわち脱分化する。癌化は脱分化ともいわれているので、癌の基礎的な研究にも役立つ。したがって細胞性粘菌は、多くの基礎生物学的な実験の材料として広く用いられている。

細胞性粘菌は集合期において、中心となる細胞がcAMPを分泌しそれによりまわりの細胞が集まってくるが、そのときcAMPを分解するホスホジエステラーゼや、そのインヒビターも分泌され、分化が巧妙に行われている。ホスホジエステラーゼがcAMPにより誘導されることは、1975年にKleinにより報告されているが、その詳細な機構については不明であった。著者は、分化の初期段階で重要な役割をはたしているホスホジエステラーゼの誘導機構を解明することにより、複雑な細胞分化の機構を解析することができるのではないかと考え、本研究に着手した。その結果次のようなことが明らかとなった。

(1) まず、細胞性粘菌の走化性運動に影響を与える種々の薬物や、cAMPの類縁物質、トリプシンなどを用いて、cAMPによるホスホジエステラーゼの誘導の特性について調べた。その結果、誘導はcAMPによる走化性運動とは無関係に、細胞表面の蛋白様のものを介してなされることが示唆された¹⁾。

(2) 次に、ホスホジエステラーゼの誘導におけるcAMPの作用部位について調べた。蛋白合成阻害剤やRNA合成阻害剤を用いた実験の結果、cAMPの作用部位として少なくとも2ヶ所が推定された。すなわち酵素合成の転写の部位と、酵素の細胞内代謝の過程である。cAMPはホスホジエステラーゼのmRNAの合成を促進し、ホスホジエステラーゼの細胞内代謝を部分的に抑制する²⁾。

(3) このようにして誘導された酵素が、どのような経路を通過して細胞外へ分泌されるかを明らかにするため、分泌前に蓄積された酵素について細胞内の存在様式を調べた。細胞分画法やショ糖密度勾配遠心法、界面活性剤などによる可溶性、charge shift電気泳動法などにより、次のようなことを示唆する結果が得られた。cAMPにより誘導されたホスホジエステラーゼの一部は細胞膜に、残りは密度の軽い細胞内顆粒に存在する。そのホスホジエステラーゼと、細胞膜または細胞内顆粒との結合はゆるくて解離しやすく、遊離した酵素はかなり親水性である³⁾。

(4) このようにして局在性がわかった細胞内顆粒型および細胞内可溶性ホスホジエステラーゼ、細胞外ホスホジエステラーゼの3種類の酵素について、その異同を明らかにするため、性質を比較検討した。細胞外酵素はすでに精製されその性質なども明らかにされているが、細胞内の酵素は量的に少ないため未精製で性質もほとんど知られていなかった。誘導されたすべての酵素を可溶性の状態にし、 K_m 値、種々の阻害剤に対する感受性などを調べた。その結果、細胞内顆粒型酵素は細胞内可溶性酵素と非常によく似ているか、もしくは同一である。しかしながらこれらの細胞内の酵素と細胞外に分泌された酵素とは基質に対する親和性の点で、若干異なっているということが示唆された⁴⁾。

(5) (1)の実験結果から、cAMPによる酵素誘導に2価イオンが関与していることが推定されていたが、それが何であるかは明らかでなかった。したがって次に、ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) やEDTA, Ca^{2+} , その他の種々の2価イオンを用いて実験を行った。その結果、cAMPによるホスホジエステラーゼの誘導に Ca^{2+} が関与していることが示唆された⁵⁾。

以上の実験結果、および他の研究者の報告をあわせて考えると、cAMPによるホスホジエステラーゼの誘導に関して次のような機構が推定される。

細胞性粘菌の細胞表面にはcAMPに対するレセプターとして、走化性運動に関与するものと、ホスホジエステラーゼの誘導に関与するものと2種類が存在し、酵素の誘導時にはcAMPは後者のレセプターに作用する¹⁾。cAMPによるホスホジエステラーゼ合成の刺激は細胞内の核に伝えられ、DNAからRNAへの転写が促進される。それにより合成されたmRNAからリボゾーム上で酵素蛋白がつくられる²⁾。このようにして合成されたホスホジエステラーゼは、おそらくいったん分泌顆粒のようなものにたくわえられ、細胞外へ分泌されるために細胞膜へ移行する。酵素の一部は細胞膜にとどまり、膜に結合したcAMPを分解しcAMPに対するレセプターの解放に役立つのであろう³⁾。酵素は細胞外へ分泌されるときあるいは分泌された後に、若干の修飾をうけるようである⁴⁾。細胞外に分泌された酵素は、他の機構で分泌されたインヒビターとともにcAMPの濃度勾配をつくり、細胞の集合をうまく調節しているのであろう。 Ca^{2+} の作用部位についてはまだわからないが、JulianiとKleinが報告しているように細胞膜レセプターへのcAMPの結合を促進することがあげられる⁵⁾。

このように細胞性粘菌の分化の初期段階では、cAMPや、これにより誘導されるホスホジエステラーゼ、インヒビターなどがからみあい、分化が複雑かつ巧妙に行われていると思われる。

参 考 文 献

1. H. Hayashi and F. Yamasaki, Chem. Pharm. Bull., **26** 2977 (1978).
2. F. Yamasaki and H. Hayashi, J. Biochem., **86**, 971 (1979).
3. F. Yamasaki and H. Hayashi, J. Biochem., **89**, 543 (1981).
4. F. Yamasaki and H. Hayashi, J. Biochem., **91**, 981 (1982).
5. F. Yamasaki and H. Hayashi, J. Biochem., **92**, 1911 (1982).

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が、その分化の過程の初期に集合して多細胞体を形成するのに際してサイクリック AMP がホスホジエステラーゼを誘導する現象について解析を加えたものであって、その結果つぎのような事柄が明確化した。

(1) 細胞性粘菌の走化性運動に影響する種々の薬物や、cAMP の類縁物質、トリプシンなどを用いて cAMP によるホスホジエステラーゼの誘導の特性について検討した結果、誘導は cAMP による走化性運動とは無関係に細胞表面の蛋白質様物質によって仲介されることを明らかにした。

(2) 誘導・合成された酵素の一部は細胞膜に、残りは密度の小さい細胞内顆粒中に存在しており、細胞膜または細胞内顆粒との結合は弱く、解離し易い。そして遊離した酵素は親水性である。

(3) ホスホジエステラーゼの誘導における cAMP の作用部位は少なくとも 2 箇所、cAMP はホスホジエステラーゼの mRNA の合成を促進し、またホスホジエステラーゼの細胞内代謝を部分的に抑制することによって酵素量を増大させる。

(4) ホスホジエステラーゼの細胞内顆粒型、細胞内可溶性型および細胞外酵素の 3 種類の型について、その異同について km 値、種々の阻害薬に対する感受性などの検討を加えた結果、細胞内顆粒型酵素は細胞内可溶性酵素と酷似していること、これら 2 つの型と細胞外に分泌された酵素とは基質親和性の点で若干異なることが明らかとなった。

(5) cAMP によるホスホジエステラーゼの誘導に関与している 2 価の金属イオンはカルシウムイオンであることがキレート試薬や 2 価金属イオン各種について添加実験を行った結果明らかになった。

これらの実験結果から著者は細胞性粘菌の細胞表面に cAMP に対するレセプターとして走化性運動に関与するものと、ホスホジエステラーゼの誘導に関与するものと 2 種類が存在し、その刺激は細胞核に伝えられて mRNA への DNA 情報の転写が促進され、ついで実際に酵素が合成されると一旦は分泌顆粒として貯わえられ、細胞外へ分泌されるために細胞膜へ移行し、一部は細胞膜にとどまり膜に結合した cAMP を分解して cAMP に対するレセプターの解放に役立つ。細胞外に分泌された酵素は構造上若干の修飾をうけており、細胞外で cAMP を分解するため細胞の周囲に cAMP の濃度勾配をつくりだし細胞の走化集合の誘因となっていることなどを考察している。

以上本研究は細胞生物学的な立場から生化学的手段を用いて研究し基礎薬学の発展に貢献したものであって薬学博士の学位を授与するに値するものと判定した。